

doi: 10.12452/j.fxcxb.25101803

基于HPLC-MS/MS的合生元发酵乳B族维生素定量分析与品质评价

杨隆徽¹, 何春磊¹, 潘明飞¹, 银佳^{2*}, 刘晓霞^{1*}

(1. 天津科技大学 省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457; 2. 广东省科学院生态环境与土壤研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 为探究不同合生元组合对功能性发酵乳中B族维生素含量及其品质的影响, 该研究选取7株益生菌(动物双歧杆菌乳亚种: BB12、BB04、BB420; 鼠李糖乳杆菌: LGG1、LGG2; 副干酪乳杆菌: Lpc1、Lpc2)与3种低聚糖(低聚果糖(FOS)、低聚异麦芽糖(IMO)、2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL))复配, 构建合生元体系并制备发酵乳。采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测发酵乳中核黄素、烟酸、烟酰胺、泛酸、磷酸吡哆醛及生物素等B族维生素的含量, 结合感官特性、黏度、pH值及酸度指标进行品质评价。结果显示, 不同的合生元组合对发酵乳中B族维生素呈现组合特异性调控, 其中低聚糖与双歧杆菌复配对多种B族维生素的提升幅度显著高于乳杆菌组合。同时, 合生元可差异化调节发酵乳黏度, 并降低其pH值与酸度。感官层面, 以乳杆菌(尤其是鼠李糖乳杆菌)构建的合生元发酵乳品质最优, 稳定性良好。该研究为富含B族维生素的功能性发酵乳开发提供了科学依据。

关键词: 功能性发酵乳; HPLC-MS/MS; B族维生素; 合生元

中图分类号: O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)04-0850-10

Quantitative Analysis of B Vitamins in Synbiotic Fermented Milk Based on HPLC-MS/MS and Quality Evaluation

YANG Long-hui¹, HE Chun-lei¹, PAN Ming-fei¹, YIN Jia^{2*}, LIU Xiao-xia^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Institute of Eco-environmental and Soil Sciences, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: To explore the effects of different synbiotic combinations on B vitamin levels and the quality of functional fermented milk, seven probiotic strains [*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12, BB04, BB420), *Lactobacillus rhamnosus* (LGG1, LGG2), and *Lactobacillus paracasei* (Lpc1, Lpc2)] were selected and combined with three oligosaccharides [fructo-oligosaccharides (FOS), isomalto-oligosaccharides (IMO), and 2'-fucosyllactose (2'-FL)] were selected to construct synbiotic systems and prepare fermented milk samples in this study. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was utilized for the quantitative determination of key B vitamins in the fermented milk, including riboflavin, nicotinic acid, nicotinamide, pantothenic acid, pyridoxal phosphate, biotin, and et al. Quality assessment was performed by integrating the analysis of sensory properties, viscosity, pH value, and acidity indices. The results demonstrated that different synbiotic combinations exerted combination-specific regulatory effects on the B vitamin profiles in fermented milk. Notably, the co-fermentation of oligosaccharides with *Bifidobacterium* strains exhibited a significantly greater enhancement in the contents of various B vitamins compared to the combinations involving *Lactobacillus* strains. Furthermore, synbiotic could differentially modulate the viscosity of fermented milk while reducing its pH value and acidity. At the sensory level, the synbiotic fermented milk formulated with *Lactobacillus* strains, particularly *Lactobacillus rhamnosus*, achieved the optimal quality and favorable stability. This study provides a scientific ba-

收稿日期: 2025-10-18; 修回日期: 2025-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32272416)

* 通讯作者: 银佳, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: spyinjia@163.com

刘晓霞, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: liuxiaoxia@tust.edu.cn

网络首发日期: 2026-02-09

sis for the development of B vitamin-enriched functional fermented milk products.

Key words: functional fermented milk; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS); B vitamins; synbiotic

发酵乳是以符合安全标准的生牛(羊)乳为原料,经杀菌、接种益生菌发酵、后熟等过程制成的低酸度产品^[1]。发酵过程中,益生菌可合成乳酸、短链脂肪酸、B族维生素等有益代谢产物,这些产物能调节肠道微环境、增强肠道屏障功能、促进人体能量代谢,对提升发酵乳制品功能性具有重要意义^[2-3]。后疫情时代,消费者对功能性食品的需求持续增长。合生元是益生菌与配对益生元的组合,其中益生元可作为益生菌的“营养源”,促进其在人体肠道的增殖和定植^[4]。研究证实,在发酵乳制备中应用合生元可从品质、风味及功能特性等多维度协同提升发酵乳性能。例如,菊粉-副干酪乳杆菌YT805合生元能增强发酵乳蛋白质网络稳定性,丰富挥发性风味物质^[5];菊粉-植物乳杆菌B13合生元可定向促进功能性成分 γ -氨基丁酸(GABA)合成,提升产品附加值^[6]。此外,复合益生元(低聚果糖:菊粉:低聚半乳糖=2:2:1)与乳杆菌复配的合生元,不仅能改善发酵乳理化性质、感官品质及风味,还可提升 α -淀粉酶活性以增强消化特性,提高对致病菌的抑制能力,为功能性发酵乳的应用提供支撑^[7]。

B族维生素作为关键辅酶因子,广泛参与生物体的分解代谢与合成代谢过程^[8]。该类维生素在免疫稳态调控、一碳单位代谢、神经元功能维持及核酸生物合成等环节中均发挥着不可替代的作用^[9-11]。B族维生素缺乏常诱发多系统功能异常,表现为认知功能减退、心血管疾病发病风险升高、代谢紊乱及炎症性疾病加剧等^[12-14]。除烟酸(VB3)外,其余B族维生素均无法通过内源性途径合成,依赖外源性来源(如膳食摄入)获取^[15]。研究表明,包括双歧杆菌属、乳酸菌属在内的多种益生菌,可通过自身发酵代谢途径合成多种B族维生素,如硫胺素(VB1)、核黄素(VB2)、泛酸(VB5)、吡哆醇(VB6)及叶酸(VB9)等^[16-17],为人体补充该类维生素提供了潜在的生物途径。

益生元不仅能有效促进配对益生菌的增殖,而且能够调节其生理功能,展现出“促生长-调功能”的双重调控效应^[4,18]。本团队前期研究证实,以低聚糖(低聚果糖、低聚异麦芽糖、2'-岩藻糖基乳糖)为益生元、特定益生菌(动物双歧杆菌乳亚种、鼠李糖乳杆菌、副干酪乳杆菌)为功能菌株所构建的合生元组合,可显著增强益生菌合成B族维生素的能力^[19]。这可能是由于益生元作为益生菌的底物,参与益生菌的生理代谢,从而影响了B族维生素的合成能力。目前,多种产B族维生素的益生菌应用于食品中,例如,植物乳杆菌BBC32B、BBC33及BIF43发酵豆乳可显著增加豆乳中VB2的水平^[20];乳酸菌发酵牛奶能够显著提升VB5的水平^[21]等。然而,合生元组合应用于发酵乳体系时,能否有效提升发酵乳中B族维生素的含量仍缺乏系统研究。

目前,国内外关于B族维生素的检测方法主要有微生物法、分光光度法、荧光分析法、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等^[22-24]。高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术因分析时间短且能准确检测多种B族维生素而广泛应用^[24-25]。因此,本研究采用HPLC-MS/MS检测不同合生元组合发酵乳中11种B族维生素的含量,包括VB1、VB2、烟酸(VB3-1)、烟酰胺(VB3-2)、VB5、吡哆醇(VB6-1)、吡哆醛(VB6-2)、磷酸吡哆醛(VB6-3)、生物素(VB7)、VB9及钴胺素(VB12),并结合感官、黏度、pH值及酸度对合生元发酵乳进行品质评价,以期为高B族维生素、高黏度且后酸弱的功能性发酵乳开发提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂、菌株与仪器

试剂:低聚果糖(FOS,纯度 $\geq 95\%$)和低聚异麦芽糖(IMO,纯度 $\geq 90\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL,纯度 $\geq 99\%$)购自上海合璞生物技术有限公司;烟酰胺- $^{13}\text{C}_6$ 溶液、氘代盐酸吡哆醇、维生素B5(二- β -丙氨酸- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$)钙盐、 $^{13}\text{C}_4$ -硫胺素盐酸盐、 $^{13}\text{C}_4$, $^{15}\text{N}_2$ -核黄素、生物素-D₄、[谷氨酸- $^{13}\text{C}_5$]-叶酸、烟酸- $^{13}\text{C}_6$ 溶液均为质谱级,购自Sigma公司;乙腈、甲醇、甲酸均为质谱级,购自Millipore公司。

菌株:动物双歧杆菌乳亚种BB-12(编号BB12)购自科汉森公司;动物双歧杆菌乳亚种BL-04(编

号 BB04)、动物双歧杆菌乳亚种 B420(编号 BB420)、鼠李糖乳杆菌 HN001(编号 LGG2)、副干酪乳杆菌 Lpc-37(编号 Lpc2)购自丹尼斯克公司;鼠李糖乳杆菌 YGG(编号 LGG1)、副干酪乳杆菌 K9(编号 Lpc1)购自广东益可维生物技术有限公司。

仪器: HAAKE MARS iQ 流变仪(ThermoFisher Scientific); DV2TLVTJ0 粘度计(Brookfield 公司); CH-9100 酸度计(Metrohm 公司); Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱仪(Agilent 公司); QTRAP 5500 质谱仪(SCIEX 公司); Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(Waters 公司)。

1.2 菌株培养

采用冷冻菌株活化法活化并培养 7 株商业化益生菌^[26]。

1.3 合生元发酵乳制备

称取 485 g 生牛乳及 15 g 低聚糖,于 65 °C 下充分溶解后,95 °C 下灭菌 5~10 min,冷却后,以 5% 接种量将益生菌接种于灭菌后的牛乳中。37 °C 下发酵 24 h,破乳后于 4 °C 完成后熟。合生元发酵乳分组情况如表 1 所示。

表 1 合生元发酵乳分组

Table 1 Groups of synbiotic fermented milk

Number	Group	Strains+Oligosaccharides
1	BB12	动物双歧杆菌乳亚种 BB-12
2	BB12-FOS	动物双歧杆菌乳亚种 BB-12+3% 低聚果糖
3	BB12-IMO	动物双歧杆菌乳亚种 BB-12+3% 低聚异麦芽糖
4	BB04	动物双歧杆菌乳亚种 BL-04
5	BB04-FOS	动物双歧杆菌乳亚种 BL-04+3% 低聚果糖
6	BB04-IMO	动物双歧杆菌乳亚种 BL-04+3% 低聚异麦芽糖
7	BB420	动物双歧杆菌乳亚种 B420
8	BB420-FOS	动物双歧杆菌乳亚种 B420+3% 低聚果糖
9	BB420-IMO	动物双歧杆菌乳亚种 B420+3% 低聚异麦芽糖
10	LGG1	鼠李糖乳杆菌 LGG1
11	LGG1-FOS	鼠李糖乳杆菌 LGG1+3% 低聚果糖
12	LGG1-2'-FL	鼠李糖乳杆菌 LGG1+3% 2'-岩藻糖基乳糖
13	LGG2	鼠李糖乳杆菌 LGG2
14	LGG2-FOS	鼠李糖乳杆菌 LGG2+3% 低聚果糖
15	LGG2-2'-FL	鼠李糖乳杆菌 LGG2+3% 2'-岩藻糖基乳糖
16	Lpc1	副干酪乳杆菌 Lpc1
17	Lpc1-IMO	副干酪乳杆菌 Lpc1+3% 低聚异麦芽糖
18	Lpc1-2'-FL	副干酪乳杆菌 Lpc1+3% 2'-岩藻糖基乳糖
19	Lpc2	副干酪乳杆菌 Lpc2
20	Lpc2-IMO	副干酪乳杆菌 Lpc2+3% 低聚异麦芽糖
21	Lpc2-2'-FL	副干酪乳杆菌 Lpc2+3% 2'-岩藻糖基乳糖

1.4 发酵乳中 B 族维生素含量的 HPLC-MS/MS 测定

1.4.1 样品前处理 从 -80 °C 冰箱中取出样本,称取 1 g 冷冻干燥 24 h。向冻干样品中加入 500 μL 预冷的含有 0.3% 甲酸的甲醇-乙腈-水(2:2:1, 体积比)溶液,涡旋混匀后,水浴超声处理 20 min,并于 -20 °C 静置 2 h 充分沉淀蛋白。随后,样品于 4 °C, 16 000 g 离心 20 min 后,取 400 μL 上清液冷冻干燥 24 h,冻干后置于 -80 °C 备用。检测前向冻干样品中加入 100 μL 预冷的 50% 甲醇溶液(含 0.1% 甲酸)复溶,于 4 °C, 20 000 g 离心 15 min 后,取 50 μL 上清液加入进样瓶中待分析。

1.4.2 标准曲线溶液制备 精确称取 11 种维生素标准品,用甲醇梯度稀释成 0.001、0.002、0.005、0.01、0.1、0.2、0.5、1 μg/mL 的混标溶液,过 0.22 μm 有机滤膜,收集滤液于液相小瓶中待检测。

1.4.3 检测条件 色谱条件:样品置于 4 °C 自动进样器中,进样量 5 μL,色谱柱: Waters UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温 45 °C。流动相 A: 5 mmol/L 甲酸铵和 0.3% 甲酸水溶液,流动相 B: 纯甲醇,流速为 300 μL/min。洗脱梯度: 0~2 min, 0% B; 2~3 min, 0%~60% B; 3~4.5 min, 60%~100% B; 4.5~6 min, 100%~5% B, 6~11 min, 5% B。

质谱条件:离子源温度: 550 °C;离子源气体 1: 379.2 kPa;离子源气体 2: 379.2 kPa;帘幕气: 275.8 kPa;离子喷雾电压: +4 500 V;采用多反应监测模式检测待测离子对,目标物质离子对信息见表 2。

表2 目标物质的质谱检测参数

Table 2 Mass spectrometry detection parameters of the target substances

Component	Abbreviation	Molecular formula	Molecular weight/ (g·mol ⁻¹)	Ion type	Retention time/min	Quantifier ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
Thiamine(硫胺素)	VB1	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	300.81	[M+X] ⁺	1.27	265.1	122.1
Riboflavin(核黄素)	VB2	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.37	[M+X] ⁺	4.64	377.0	243.0
Nicotinic acid(烟酸)	VB3-1	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	[M+X] ⁺	2.45	124.0	80.2
Nicotinamide(烟酰胺)	VB3-2	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.12	[M+X] ⁺	2.83	123.0	53.0
Pantothenic acid(泛酸)	VB5	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.24	[M+X] ⁺	4.64	220.1	89.8
Pyridoxine(吡哆醇)	VB6-1	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.18	[M+X] ⁺	3.71	170.1	77.0
Pyridoxal(吡哆醛)	VB6-2	C ₈ H ₉ NO ₃	151.16	[M+X] ⁺	2.20	168.0	150.1
Pyridoxal 5'-phosphate (磷酸吡哆醛)	VB6-3	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P	247.14	[M+X] ⁺	3.28	248.1	150.0
Biotin(生物素)	VB7	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.31	[M+X] ⁺	4.71	245.2	227.2
Folic acid(叶酸)	VB9	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.40	[M+X] ⁺	4.64	442.2	295.1
Cobalamin(钴胺素)	VB12	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1355.38	[M+X] ⁺	4.62	678.5	147.1

1.5 发酵乳感官评价

发酵乳感官评价参照 GB 19302-2010《食品安全国家标准 发酵乳》^[27], 稍作修改。由 10 位感官评估人员针对不同益生菌与低聚糖组合发酵后制备的益生菌发酵乳产品的表现状态、口感、风味、气味和整体进行感官评定; 评分标准见表 3。感官评定后, 统计感官评价打分结果, 绘制雷达图。

表3 感官评定标准

Table 3 Sensory evaluation standards

Evaluation item	Evaluation criteria	Score
感官状态	状态均匀细腻, 不分层, 无乳清析出	8~10
	状态较均匀, 基本不分层, 少量乳清析出	4~7
	状态不均匀, 颗粒粗糙, 分层明显, 大量乳清析出	0~3
口感	酸度适中, 口感细腻爽滑	8~10
	酸度过量或不足, 口感较为细腻	4~7
	酸度比例差, 口感粗糙	0~3
风味	发酵香气浓郁	8~10
	发酵香味较浓郁	4~7
	发酵香味较淡或无香味	0~3
气味	气味协调, 无异味	8~10
	气味较协调, 无明显异味	4~7
	气味不协调, 有异味	0~3
整体评分	非常喜欢	8~10
	一般喜欢	4~7
	不喜欢	0~3

1.6 发酵乳表观黏度测定

使用 Haake RS6000 旋转流变仪, 在恒温 20 °C 条件下, 剪切速率从 0 增至 200 s⁻¹, 测定样品的流变学特性, 采取三段式剪切扫描模式, 观察 200 s⁻¹ 高频率剪切破坏后样品的应力恢复情况^[28]。

1.7 发酵乳贮藏期内黏度测定

取适量样品置于 50 mL 离心管中, 使用黏度仪的 64# 转子, 50 r/min 下测定 30 s, 每个样品平行测定 3 次。

1.8 发酵乳贮藏期内 pH 值和酸度的测定

分别于 0、7、14、21、28 d 取适量于 4 °C 保存的样品, 恢复至室温后, 利用 pH 计测定样品在贮藏期内的 pH 值; 分别于 0、7、14、21、28 d 取 9~12 g 于 4 °C 保存的样品, 加入 2 倍质量的纯水后, 混合均匀, 待恢复至室温后, 用酸度仪测定样品在贮藏期内的滴定酸度。

1.9 数据统计与分析

HPLC-MS/MS 数据采用 MultiQuant 软件提取色谱峰面积及保留时间。使用维生素标准品校正保留时间, 进行代谢物鉴定。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)配合 Tukey 检验进行统计学显著性分析, 通过 Graphpad Prism 8.0 软件进行可视化处理, 结果以平均值±标准平均误差(SEM)表示。

2 结果与讨论

2.1 B族维生素标准品的提取离子色谱图

B族维生素标准品的提取离子色谱图(XIC)如图1所示,各目标化合物在其特征离子通道中均呈现清晰、稳定且可重复的色谱响应,峰形良好、信噪比较高,为后续的准确定性与定量分析提供了良好的信号基础。

2.2 B族维生素检测方法的线性、检出限与定量下限

为排除基质对定量的干扰,采用基质匹配标准曲线进行定量分析。使用不同浓度的11种B族维生素混合标准溶液建立标准曲线,如表4所示,11种目标物质具有良好的线性关系,线性范围为0.001~1 μg/mL, r^2 均大于0.99,可用于后续定量分析。以3倍信噪比($S/N=3$)定义检出限(LOD),10倍信噪比($S/N=10$)定义定量下限(LOQ),如表4所示,各维生素的LOD与LOQ分别为0.001~0.01 μg/mL和0.003~0.030 μg/mL,显示该方法具有较高的检测灵敏度。

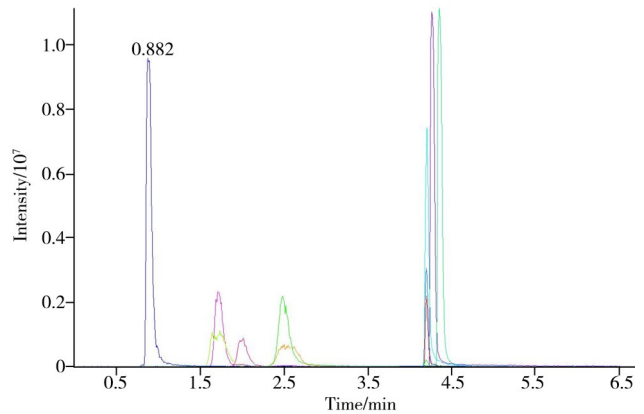


图1 标准品混合物的XIC图谱

Fig. 1 XIC chromatograms of the standard mixture

表4 B族维生素检测方法的线性、检出限、定量下限

Table 4 Linearity, LODs, and LOQs for B vitamins

Component	Calibration curve equation	r^2	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
VB1	$y=1.66765\times 10^8x-1.65136\times 10^6$	0.99876	0.002	0.006
VB2	$y=2.57085\times 10^7x-1.51974\times 10^4$	0.99874	0.003	0.010
VB3-1	$y=7.41440\times 10^6x+2.11005\times 10^5$	0.99913	0.001	0.004
VB3-2	$y=3.51417\times 10^6x+1.13731\times 10^5$	0.99898	0.001	0.003
VB5	$y=3.29715\times 10^6x+5.76512\times 10^4$	0.99878	0.002	0.007
VB6-1	$y=1.00893\times 10^7x$	0.99701	0.002	0.006
VB6-2	$y=5.79796\times 10^6x+5.93593\times 10^4$	0.99931	0.003	0.010
VB6-3	$y=6.66173\times 10^6x-7.73161\times 10^3$	0.99919	0.004	0.012
VB7	$y=6.83797\times 10^6x+3.62561\times 10^4$	0.99897	0.005	0.015
VB9	$y=1.79316\times 10^7x-1.80612\times 10^4$	0.99864	0.006	0.020
VB12	$y=5.05802\times 10^6x-4.90007\times 10^4$	0.99184	0.01	0.030

2.3 实验质量控制评价

质控(QC)样本用所有发酵乳待测样本等量混合制备,各维生素在QC样本中检测结果的相对标准偏差(RSD)小于30%,表明本方法的重复性良好,检测数据稳定可靠。采用低、中、高3个加标水平(加标量为1倍、5倍、10倍LOQ)进行回收率验证,结果显示:各维生素的回收率为82.5%~115%,RSD<8%,表明该方法在不同浓度区间均具有良好的准确度与精密度。通过基质匹配样品与溶剂标准品的响应比值评估基质效应,结果显示各维生素的基质效应为85%~108%,说明离子抑制或增强效应较小,基质干扰可控。本方法在稳定性、准确性、重复性及抗基质干扰方面均表现良好,适用于B族维生素的LC-MS/MS定量检测。

2.4 不同合生元组合对发酵乳中B族维生素水平的影响

为评估不同益生菌-低聚糖组合对发酵乳中B族维生素合成的调控效应,利用HPLC-MS/MS对发酵乳中11种B族维生素进行定量分析。如图2A所示,动物双歧杆菌乳亚种BB04与3%FOS或IMO复配后,发酵乳中VB2、VB3-1、VB3-2、VB5、VB6-1、VB6-2、VB6-3、VB7及VB9的含量均较对照组显著升高($p<0.01$);仅BB04与IMO的复配组合可显著提升VB1含量($p<0.01$),而BB04与FOS复配对VB1水平无显著影响。动物双歧杆菌乳亚种BB12与3%FOS和IMO复配后,发酵乳中VB1、VB2、VB3-2、VB5、VB6-1、VB6-2、VB6-3、VB7及VB12的含量均显著高于对照组($p<0.05$);此外,BB12与FOS的复配组合还可显著提升VB3-1和VB9的含量($p<0.01$),而BB12与IMO复配对这两种维生素的水平无显著调控作用。与前两种菌株不同,BB420与3%FOS或IMO复配能显著提升发酵乳中

VB3-2和VB5的含量($p < 0.01$)。此外,仅BB420与IMO的复配组合可显著提高VB6-3含量($p < 0.01$);相反,该菌株与两种低聚糖复配后,均导致发酵乳中VB1、VB3-1、VB6-1及VB6-2的含量显著降低($p < 0.05$)。综上,低聚糖FOS或IMO对动物双歧杆菌乳亚种的B族维生素合成能力具有菌株特异性调控作用。其中,两种低聚糖均可显著增强BB04和BB12在发酵乳中的多种B族维生素合成能力,而对BB420的维生素合成则表现为“选择性促进”(仅VB3-2、VB5,部分组合含VB6-3),且对多数B族维生素(VB1、VB3-1、VB6-1、VB6-2)的合成存在显著抑制效应,整体调控效果较弱。

此外,本研究对不同乳杆菌-低聚糖组合发酵乳中B族维生素的含量进行检测,如图2B所示,鼠李糖乳杆菌LGG1与FOS或2'-FL复配后,发酵乳中VB1、VB2、VB3-2、VB6-1、VB6-2、VB12的含量均显著低于对照组($p < 0.05$),而VB3-1、VB5、VB7、VB9的水平无显著变化;VB6-3含量在LGG1与FOS复配组中较对照组显著提升($p < 0.01$)。LGG2与FOS或2'-FL复配后,发酵乳中VB5含量均显著提高($p < 0.01$),VB1、VB3-2、VB6-1、VB6-2、VB9的含量均显著低于对照组($p < 0.01$)。其部分影响呈现对不同低聚糖产生的特异性:与FOS复配时,VB2、VB3-1、VB5、VB6-3及VB7的含量显著升高($p < 0.01$),与2'-FL复配时VB2、VB3-1、VB5、VB6-3显著降低($p < 0.01$);对于VB12则相反,与2'-FL复配时显著升高($p < 0.05$),与FOS复配时显著降低($p < 0.01$)。对于副干酪乳杆菌,Lpc1与IMO或2'-FL复配后,发酵乳中VB1、VB3-1、VB3-2、VB5、VB6-1、VB6-2的含量均显著低于对照组($p < 0.01$),VB12的水平无显著变化,而VB2显著上升($p < 0.01$),但Lpc1与IMO复配后,VB6-3的含量显著上升,而与2'-FL复配后VB6-3、VB7、VB9含量显著下降;Lpc2与IMO复配后,VB1、VB3-1、VB3-2、VB5、VB6-2含量显著下降($p < 0.05$);与2'-FL复配时,VB12含量显著提升($p < 0.05$),VB1、VB5含量显著下降($p < 0.05$),其他B族维生素水平均无显著变化。

综上,乳杆菌-低聚糖组合对B族维生素的调控呈现显著的菌株-底物特异性:鼠李糖乳杆菌LGG1与2'-FL复配仅能提升发酵乳中VB6-3的含量,LGG2与FOS的组合在提升VB2、VB3-1、V5、V6-3及VB7方面表现突出,而LGG2与2'-FL的组合可定向增强VB12的合成;副干酪乳杆菌Lpc1与IMO的组合仅能提升VB2和VB6-3,而Lpc2与2'-FL的组合仅能提升发酵乳中VB12的含量。

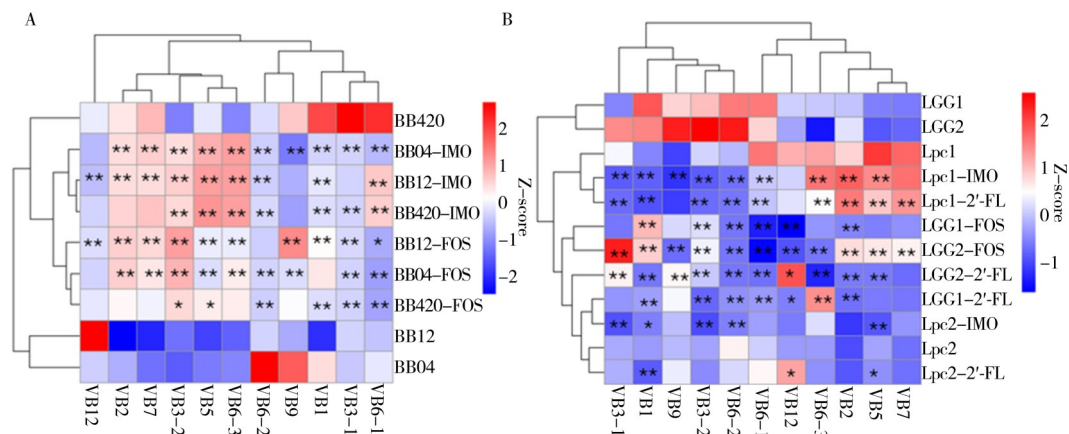


图2 不同合生元组合对发酵乳中11种B族维生素水平的影响

Fig. 2 Effects of different combinations of synbiotic on vitamin levels in fermented milk

A. *Bifidobacteria*; B. *Lactobacilli*; compared with the glucose group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. All experiments were repeated three times (A. 双歧杆菌; B. 乳杆菌; 与葡萄糖组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 所有实验重复3次)

2.5 不同合生元组合对发酵乳感官评价的影响

为评价不同合生元组合对发酵乳风味口感等的影响,由感官鉴定小组对合生元发酵乳的表观状态、气味、口感、风味和整体展开评价。如图3所示,在表观状态维度:双歧杆菌制备的发酵乳得分为6.5~7.5,而鼠李糖乳杆菌制备的发酵乳得分为8.5~9;副干酪乳杆菌制备的发酵乳得分为8~8.5;在气味方面:双歧杆菌制备的发酵乳得分为7~7.5,而鼠李糖乳杆菌制备的发酵乳得分为7.5~8.5,副干酪乳杆菌制备的发酵乳得分为7~8;在口感方面:双歧杆菌制备的发酵乳得分为6.5~7.5,而鼠李糖乳杆菌制备的发酵乳得分为7.5~8.5,副干酪乳杆菌制备的发酵乳得分为7.5~8;在风味方面:双歧杆菌制备的发酵乳得分为6~6.5,而鼠李糖乳杆菌制备的发酵乳得分为7~7.5,副干酪乳杆菌制备的发酵乳

得分为7~7.5；在整体评价方面：双歧杆菌制备的发酵乳得分为6.5~7，而鼠李糖乳杆菌制备的发酵乳得分为7~8，副干酪乳杆菌制备的发酵乳得分为6.5~7.5。综上，乳杆菌发酵后的发酵乳在外观、质地和口感上均优于双歧杆菌单独发酵制备的发酵乳，其中鼠李糖乳杆菌发酵制备的发酵乳，质地均匀、口感顺滑、无明显析水，整体接受度更高。

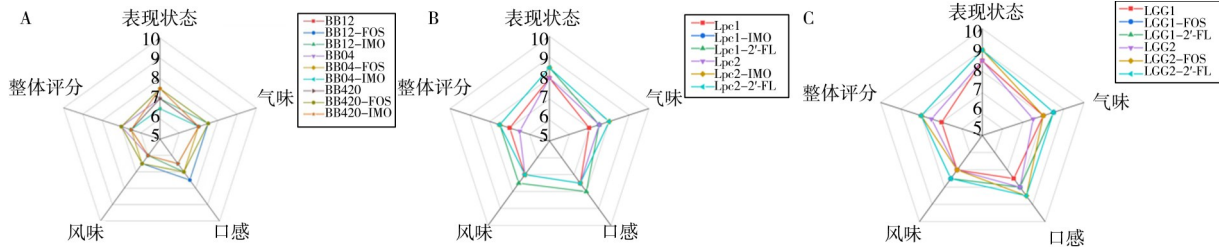


图3 不同合生元发酵乳的感官评价

Fig. 3 Sensory evaluation of different synbiotic fermented milks

A. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*+3% oligosaccharides; B. *Lactobacillus rhamnosus*+3% oligosaccharides; C. *Lactobacillus paracasei*+3% oligosaccharides. All experiments were repeated three times (A. 动物双歧杆菌乳亚种+3%低聚糖; B. 鼠李糖乳杆菌+3%低聚糖; C. 副干酪乳杆菌+3%低聚糖。所有实验重复3次)

2.6 不同合生元组合对发酵乳表观黏度的影响

为评价不同合生元组合对发酵乳黏度的影响，在发酵乳样品完成后熟过程后，取部分样品利用流变仪测定表观黏度。如图4A~C所示，动物双歧杆菌乳亚种BB12和BB420联合FOS或IMO发酵制备的发酵乳表观黏度高于单菌发酵，而IMO效果更佳；但动物双歧杆菌乳亚种BB04联合低聚糖发酵后，其表观黏度低于不添加低聚糖组。如图4D、E所示，鼠李糖乳杆菌LGG1、LGG2发酵生牛乳过程中加入低聚糖均可提高发酵乳的表观黏度，其中LGG2联合2'-FL对表观黏度的提高最明显。如图4F、G所示，低聚糖对副干酪乳杆菌菌株发酵生牛乳后所获得样品的表观黏度略有提高。

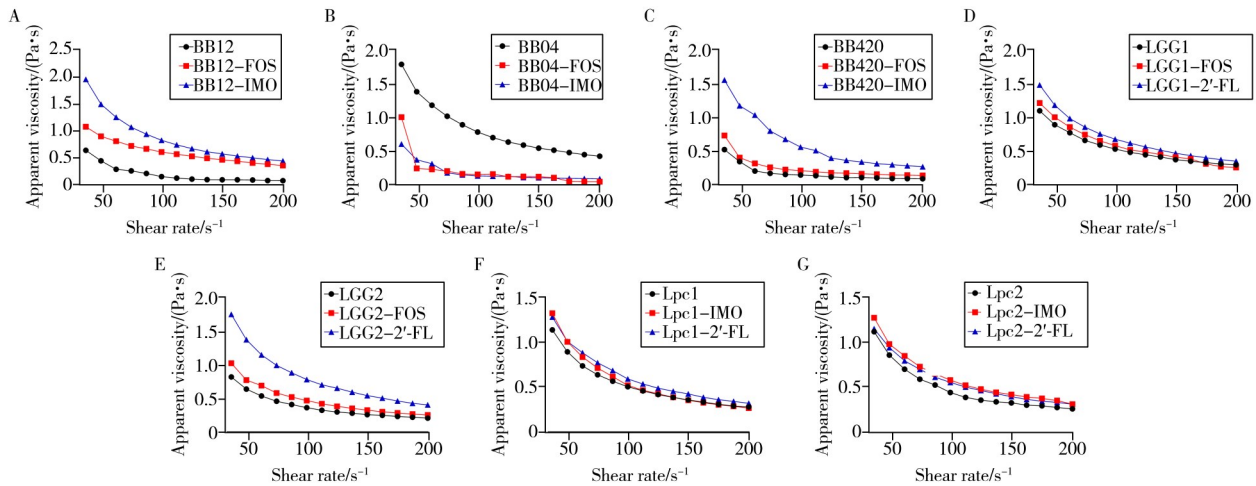


图4 不同合生元发酵乳表观粘度的测定

Fig. 4 Determination of apparent viscosity of different synbiotic fermented milks

A-C. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*+3% oligosaccharides; D-E. *Lactobacillus rhamnosus*+3% oligosaccharides; F-G. *Lactobacillus paracasei*+3% oligosaccharides. All experiments were repeated three times (A-C. 动物双歧杆菌乳亚种+3%低聚糖; D-E. 鼠李糖乳杆菌+3%低聚糖; F-G. 副干酪乳杆菌+3%低聚糖。所有实验重复3次)

2.7 不同合生元组合对发酵乳贮藏期内黏度的影响

为监测不同合生元组合对保质期内发酵乳黏度的影响，在发酵乳样品完成后熟过程后，分别于0、7、14、21、28 d取样品进行黏度测定。如图5A~C所示，与未添加低聚糖的对照组相比，动物双歧杆菌乳亚种BB12联合FOS或IMO制备的发酵乳的黏度在保质期内均显著高于对照组($p < 0.05$)；而动物双歧杆菌乳亚种BB04联合FOS或IMO制备的发酵乳的黏度在保质期内均显著低于对照组($p < 0.05$)；此外，动物双歧杆菌乳亚种BB420联合IMO制备的发酵乳的黏度在保质期无明显变化，而与FOS复配时，在贮藏28 d后，其黏度显著高于对照组($p < 0.05$)。如图5D、E所示，鼠李糖乳杆菌LGG1和LGG2与

FOS 或 2'-FL 复配发酵后, 发酵乳在保质期内黏度整体呈上升趋势, 且显著高于未添加低聚糖组 ($p < 0.05$); 此外, 如图 5F、G 所示, 副干酪乳杆菌菌株与 2'-FL 复配发酵后, 发酵乳黏度在保质期内显著高于未添加低聚糖的对照组 ($p < 0.05$), 但复配 IMO 则无显著效果。

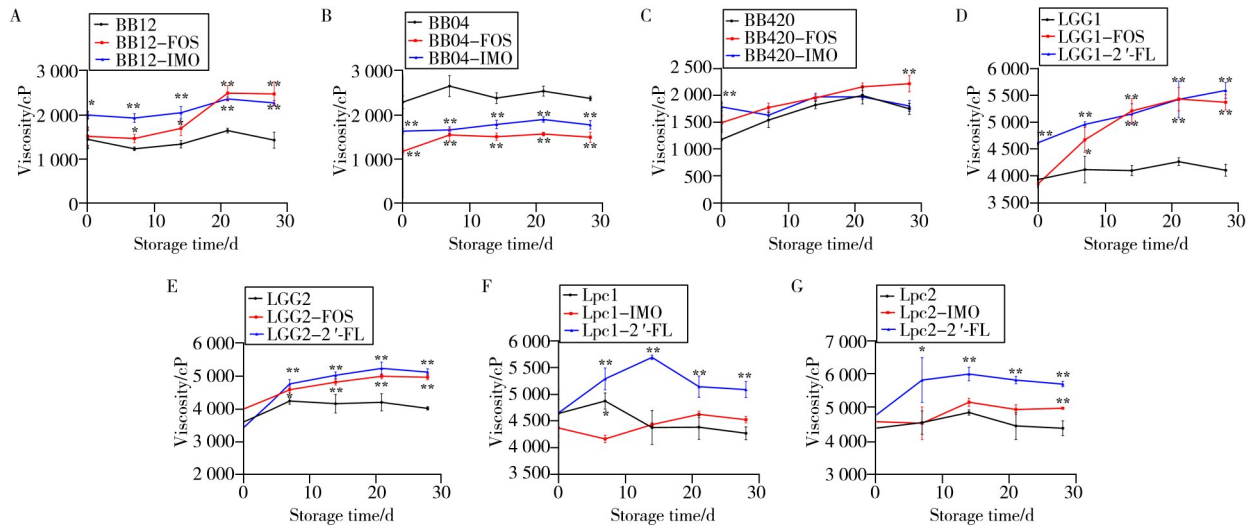


图5 不同合生元发酵乳在贮藏期内黏度的测定

Fig. 5 Determination of viscosity of different synbiotic fermented milks during storage

A-C. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*+3% oligosaccharides; D-E. *Lactobacillus rhamnosus*+3% oligosaccharides; F-G. *Lactobacillus paracasei*+3% oligosaccharides; compared with the oligosaccharide-free control group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. All experiments were repeated three times (A-C. 动物双歧杆菌乳亚种+3% 低聚糖; D-E. 鼠李糖乳杆菌+3% 低聚糖; F-G. 副干酪乳杆菌+3% 低聚糖; 与未添加低聚糖对照组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 所有实验重复3次)

2.8 不同合生元组合对发酵乳贮藏期内 pH 值和酸度的影响

2.8.1 不同双歧杆菌与低聚糖组合的影响 为监测不同双歧杆菌类合生元组合对贮藏期内发酵乳 pH 值和酸度的影响, 在发酵乳样品完成后熟过程后, 分别于 0、7、14、21、28 d 取样品利用 pH 计和酸度仪进行测定。如表 5 所示, 动物双歧杆菌乳亚种菌株与 FOS 或 IMO 复配制备的发酵乳在贮藏期内 pH 值显著高于未添加低聚糖的发酵乳 ($p < 0.01$), 而酸度显著低于未添加低聚糖的发酵乳 ($p < 0.01$)。结果表明, 添加低聚糖不会促使动物双歧杆菌乳亚种 BB12、BB04 和 BB420 发酵产生过多的酸性物质, 研究结果与文献报道^[22]一致。

表5 双歧杆菌发酵乳在贮藏期内 pH 和酸度的变化

Table 5 Changes in pH and acidity of fermented milks fermented by *Bifidobacteria* during storage

Group	Parameter	0 Day	7 Day	14 Day	21 Day	28 Day
BB12	pH	4.25±0.03	4.19±0.01	4.15±0.01	4.13±0.03	4.01±0.01
	Acidity(°T)	154.06±1.33	171.67±1.08	178.47±0.55	196.60±1.09	205.21±2.10
BB12-FOS	pH	4.91±0.02**	4.76±0.02**	4.63±0.02**	4.49±0.02**	4.28±0.02**
	Acidity(°T)	62.91±1.21**	73.06±0.96**	85.86±0.98**	98.14±1.12**	102.84±1.00**
BB12-IMO	pH	4.87±0.01**	4.75±0.01**	4.63±0.00**	4.42±0.01**	4.24±0.02**
	Acidity(°T)	65.03±1.35**	74.79±1.08**	88.48±0.85**	98.71±1.09**	104.16±1.21**
BB04	pH	4.21±0.02	4.11±0.01	4.02±0.01	4.03±0.02	3.96±0.01
	Acidity(°T)	117.52±1.29	123.29±0.79	145.76±3.04	155.39±0.60	163.01±1.10
BB04-FOS	pH	4.95±0.02**	4.93±0.01**	4.83±0.03**	4.65±0.02**	4.43±0.02**
	Acidity(°T)	62.64±1.13**	69.11±1.11**	76.95±1.10**	86.08±0.87**	92.84±0.76**
BB04-IMO	pH	4.94±0.03**	4.86±0.01**	4.75±0.03**	4.65±0.02**	4.44±0.02**
	Acidity(°T)	64.60±1.77**	72.71±1.51**	79.57±1.00**	87.46±0.87**	94.22±1.21**
BB420	pH	4.25±0.03	4.14±0.02	4.12±0.02	4.03±0.03	4.01±0.02
	Acidity(°T)	124.92±1.54	150.19±1.16	176.28±0.72	183.85±1.25	188.16±1.15
BB420-FOS	pH	4.85±0.04**	4.74±0.02**	4.68±0.03**	4.50±0.02**	4.36±0.03**
	Acidity(°T)	69.47±0.81**	74.23±0.63**	86.20±1.96**	96.31±1.09**	100.50±1.07**
BB420-IMO	pH	4.84±0.02**	4.72±0.02**	4.64±0.03**	4.49±0.01**	4.31±0.01**
	Acidity(°T)	67.50±1.73**	75.82±0.46**	85.07±1.68**	94.14±1.41**	106.54±0.88**

compared with the control group without oligosaccharide supplementation: ** $p < 0.01$; all experiments were repeated three times

2.8.2 不同乳杆菌与低聚糖组合的影响 如表6所示,鼠李糖乳杆菌LGG1与FOS复配制备的发酵乳在贮藏期内pH值显著高于未添加低聚糖的发酵乳($p < 0.01$),而酸度显著低于未添加低聚糖的发酵乳($p < 0.01$);鼠李糖乳杆菌LGG1与2'-FL复配发酵后,发酵乳在贮藏期内,pH值除第7天显著高于对照组外,与对照组均无显著差异,而酸度则显著低于对照组($p < 0.01$)。同时,鼠李糖乳杆菌LGG2与FOS或2'-FL复配制备的发酵乳在贮藏期内pH值显著高于对照组,而酸度则显著低于对照组($p < 0.01$)。

此外,副干酪乳杆菌Lpc1与IMO复配制备的发酵乳在贮藏期内的pH值显著高于对照组,而酸度显著低于对照组($p < 0.05$);但当副干酪乳杆菌Lpc1与2'-FL复配发酵后,发酵乳在贮藏期内pH值与对照组无显著差异,酸度低于对照组;副干酪乳杆菌Lpc2与IMO复配制备的发酵乳在贮藏期内的pH值与对照组无显著差异,而酸度除第21天外均显著低于对照组($p < 0.05$);但副干酪乳杆菌Lpc2与2'-FL复配制备的发酵乳在贮藏期内的pH值和酸度与对照组无显著差异;以上研究结果与文献报道^[29]一致。

表6 乳杆菌发酵乳在贮藏期内pH和酸度的变化

Table 6 Changes in acidity of fermented milks fermented by *Lactobacilli* during storage

Group	Parameter	0 Day	7 Day	14 Day	21 Day	28 Day
LGG1	pH	3.84±0.00	3.78±0.02	3.77±0.02	3.75±0.01	3.70±0.01
	Acidity(°T)	166.59±1.11	169.33±0.67	170.15±0.54	179.59±1.44	186.78±0.69
LGG1-FOS	pH	3.98±0.01**	3.94±0.00**	3.84±0.02**	3.82±0.02**	3.73±0.01*
	Acidity(°T)	133.59±1.58**	140.75±1.17**	145.52±1.24**	155.37±1.11**	160.26±0.84**
LGG1-2'-FL	pH	3.86±0.01	3.85±0.01**	3.80±0.01	3.77±0.01	3.71±0.01
	Acidity(°T)	149.27±0.70**	155.00±0.63**	156.82±0.18**	161.81±1.36**	166.89±1.10**
LGG2	pH	4.14±0.02	4.08±0.02	4.05±0.02	4.00±0.02	3.89±0.01
	Acidity(°T)	136.91±1.17	141.62±1.17	155.29±1.16	160.40±0.81	163.18±1.68
LGG2-FOS	pH	4.71±0.01**	4.52±0.01**	4.32±0.02**	4.19±0.01**	4.15±0.01**
	Acidity(°T)	81.93±0.73**	91.60±0.80**	102.10±1.20**	109.63±0.73**	112.68±0.61**
LGG2-2'-FL	pH	4.52±0.01**	4.29±0.01**	4.17±0.00**	4.04±0.01	3.94±0.01*
	Acidity(°T)	93.48±1.02**	100.62±0.55**	112.93±0.98**	123.41±1.07**	127.76±2.63**
Lpc1	pH	4.25±0.01	4.03±0.02	3.96±0.00	3.92±0.02	3.87±0.01
	Acidity(°T)	107.32±1.06	126.01±0.37	137.15±0.44	145.75±0.68	152.86±1.74
Lpc1-IMO	pH	4.32±0.03*	4.06±0.00	3.95±0.00	3.87±0.02*	3.78±0.02**
	Acidity(°T)	102.75±0.61**	119.40±0.70**	133.75±0.38*	141.48±0.85**	146.37±1.08**
Lpc1-2'-FL	pH	4.26±0.02	4.02±0.02	3.95±0.01	3.88±0.01	3.84±0.02
	Acidity(°T)	106.88±0.97	120.42±1.26**	133.77±1.31*	143.78±0.97	148.73±1.10*
Lpc2	pH	3.87±0.02	3.78±0.01	3.74±0.03	3.72±0.02	3.64±0.03
	Acidity(°T)	145.35±0.30	165.65±0.78	178.11±1.37	181.90±0.89	189.75±1.59
Lpc2-IMO	pH	3.86±0.01	3.79±0.02	3.75±0.01	3.66±0.02*	3.63±0.01
	Acidity(°T)	152.43±0.80**	161.67±1.28**	169.14±0.50**	181.43±1.40	185.26±0.93*
Lpc1-2'-FL	pH	3.88±0.01	3.75±0.01	3.73±0.02	3.68±0.00	3.60±0.02
	Acidity(°T)	145.72±0.50	163.09±0.46	176.23±0.90	183.66±0.67	192.03±1.91

compared with the control group without oligosaccharide supplementation: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; all experiments were repeated three times

3 结 论

本研究借助HPLC-MS/MS探究了不同合生元组合对发酵乳中B族维生素含量的影响,并结合感官特性、黏度、pH值及酸度指标分析,对功能性发酵乳进行综合品质评价。研究发现,不同合生元组合对B族维生素的调控效应存在明显差异,其中低聚糖与双歧杆菌复配对多种B族维生素的提升幅度显著高于乳杆菌组合,尤其是BB12+FOS组合和BB04+IMO组合。同时,合生元可差异化调节发酵乳黏度,并降低其pH值与酸度。感官层面,以乳杆菌(尤其是鼠李糖乳杆菌)构建的合生元发酵乳表现最优,稳定性良好,尤其是LGG1+FOS组合和LGG2+2'-FL组合。综上,不同合生元组合对发酵乳各项指标的调控作用存在差异,筛选适配组合可为开发高B族维生素、高黏度且后酸弱的功能性发酵乳提供关键理论支撑。

参考文献:

- [1] Wu Y, Han W J, Yi C J, Kong F J, Wu L J D L G. *Dairy and Humans* (吴阳, 韩文静, 仪垂江, 孔凡军, 乌力吉德力根. 乳品与人类), 2024, (2): 31-37.
- [2] Maftei N M, Raileanu C R, Balta A A, Ambrose L, Boev M, Marin D B, Lisa E L T. *Microorganisms*, 2024, 12 (2): 234-262.

- [3] Ma L, Tu H, Chen T. *Nutrients*, **2023**, 15(2): 291–311.
- [4] Swanson K S, Gibson G R, Hutkins R, Reimer A R, Reid G, Verbeke K, Scott K P, Holscher H D, Azad M B, Delzenne N M, Sanders M E. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.*, **2020**, 17(11): 687–701.
- [5] Yang J X, Liu Y W, Liu J H, Zhang X R, Zhu Y T, Chen Y, Gong G Z, Tao M F. *LWT*, **2025**, 230: 118185.
- [6] Kwon M J, Park Y H, Kim J H, Lee J M, Lee S O, Lee S P. *Food Sci. Biotechnol.*, **2025**, 34(12): 2843–2853.
- [7] Liu Y, Liu X, Zhang L, Li Q, Qu H, Chen D, Wang K, Gu R. *Food Chem.*, **2025**, 18(30): 102929.
- [8] Hossain K S, Amarasena S, Mayengbam S. *Microorganisms*, **2022**, 10(6): 1168.
- [9] Wan Z, Zheng J, Zhu Z, Sang L, Zhu J, Luo S, Zhao Y, Wang R, Zhang Y, Hao K, Chen L, Du J, Kan J, He H. *Front. Nutr.*, **2022**, 9: 1031502.
- [10] Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. *Front. Nutr.*, **2019**, 6: 434971.
- [11] Parra M, Stahl S, Hellmann H. *Cells–Basel*, **2018**, 7(7): 84–111.
- [12] Fenech M. *Adv. Nutr.*, **2017**, 8: 958–970.
- [13] Bjorklund G, Peana M, Dadar M, Lozynska I, Chirumbolo S, Lysiuk R, Lenchuk L, Upyr T, Severin B. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2022**, 62: 5462–5475.
- [14] Sikora S K, Spady D, Prosser C, El-Matary W. *Clin. Pediatr.*, **2011**, 50(6): 488–492.
- [15] Hrubša M, Siatka T, Nejmanová I, Vopršalová M, Kujovská K L, Matoušová K, Javorská L, Macáková K, Mercolini L, Remião F, Mátuš M, Mladěnka P. *Nutrients*, **2022**, 14(3): 484–567.
- [16] Yoshii K, Hosomi K, Sawane K. *Front. Nutr.*, **2019**, 6: 48–59.
- [17] Kim J Y, Choi E J, Lee J H, Yoo M S, Heo K, Shim J J, Lee J L. *Appl. Sci.–Basel*, **2021**, 11(13): 5765–5782.
- [18] Zhang M M, Cheng J Q, Lu Y R, Yi Z H, Yang P, Wu X T. *World J. Gastroentero.*, **2010**, 16(31): 3970–3978.
- [19] Guangdong Yantang Dairy Co., Ltd. China Patent(广东燕塘乳业股份有限公司. 中国专利), CN117898432 B. [2024–11–15].
- [20] Hou J W, Yu R C, Chou C C. *Food Res. Int.*, **2000**, 33(5): 393–397.
- [21] Gaucheron F. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2011**, 30(S1): 400S–409S.
- [22] Hampel D, Allen L H. *Crit. Rev. Food Sci.*, **2016**, 56(3): 494–511.
- [23] Li N. *Establishment and Application of Methods for Determination of Amino Acids and B Vitamins in Breast Milk*. Lanzhou: Lanzhou University(李娜. 母乳中氨基酸和B族维生素检测方法的建立及应用研究. 兰州: 兰州大学), **2021**.
- [24] Wang D, Zhu X M. *China Food Saf. Mag.* (王丹, 朱小梅. 食品安全导刊), **2019**, (15): 103.
- [25] Yin J, Peng X, Yang A, Lin M, Ji K, Dai X, Huang J, Li L, Feng L. *Int. J. Food. Sci. Tech.*, **2024**, 59(9): 6044–6064.
- [26] Zhao A, Li X R, Fan X P, Gao W W, Shang J C, Wan F, Meng X C. *Sci. Technol. Food Ind.* (赵桢, 李欣芮, 范小飘, 高文文, 尚佳萃, 万峰, 孟祥晨. 食品工业科技), **2020**, 41(20): 307–313.
- [27] GB 19302–2010. National Food Safety Standard–Fermented Milk. National Standards of the People’s Republic of China(食品安全国家标准 发酵乳. 中华人民共和国国家标准).
- [28] Huang J, Huang Y Y, Peng X X. *Sci. Technol. Food Ind.* (黄娟, 黄燕燕, 彭小霞. 食品工业科技), **2022**, 43(15): 148–156.
- [29] Almutairi B, Turner M S, Fletcher M T, Sultanbawa Y. *LWT*, **2021**, 137: 110356.

(责任编辑: 丁 岩)